

Original

QUEMADOS

Biompresión 3D de piel

3D skin bioprinting



Bolgiani A.

Alberto BOLGIANI*

Elida HERMIDA**

Resumen

Abstract

La impresión 3D es un proceso que convierte gráficos 3D en objetos tridimensionales de manera similar a imprimir en 2D sobre un papel. Se imprime en 3D un trozo de piel de diferentes tipos de células humanas cultivadas *in vitro* o células epidérmicas incorporadas en un solo paso, utilizando una impresora 3D en la que la tinta biológica está compuesta por células vivas en suspensión en un líquido y preparado en un cartucho, siendo expulsada mediante flujo continuo. Esta sustancia contiene diferentes tipos de células: fibroblastos, queratinocitos y melanocitos que constituyen la epidermis.

La bioimpresión 3D de piel facilita la fabricación de un modelo de piel humana más compleja que incorpora estructuras secundarias y anexiales para lograr un avance en nuestra comprensión de la piel humana como un órgano, lo que permite la bioingeniería de injertos en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, así como en el paciente quemado.

3D printing is a process that converts 3D graphics dimensional objects similarly 2D printing on paper. 3D is printed on a piece of skin of different types of cultured human cells *in vitro* using a 3D printer that biological ink are composed of living cells in suspension in a liquid and made into a cartridge; it is expelled by a laser. This substance contains different types of cells: fibroblasts, keratinocytes and melanocytes which constitute the epidermis.

3D printing skin facilitates manufacture of a more complex model incorporating secondary human skin and anexal structures to achieve a breakthrough in our understanding of human skin as an organ, allowing the graft engineering in treatment of various skin diseases and burn patients.

Palabras clave Bioimpresión, Bioingeniería tisular, Impresión piel, Impresión tridimensional.

Nivel de evidencia científica 5b Opinión de experto
Recibido (esta versión) 2 octubre/2019
Aceptado 25 enero/2020

Key words Bioprinting, Tissue Bioengineering, Skin printing, Tridimensional printing.

Level of evidence 5b Expert opinion
Received (this version) 2 October/2019
Accepted 25 January/2020

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún interés financiero relacionado con el contenido de este artículo.

Financiación: No hubo fuentes externas de financiación para este trabajo.

* Jefe de Equipo del Centro de Excelencia para la Asistencia en Quemaduras (CEPAQ) Hospital Alemán, Fundación Benaim. Director de la Carrera de Cirugía Plástica de la Universidad del Salvador (USAL), Buenos Aires, Argentina

** Profesora Titular de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Secretaria Académica de la Escuela de Ciencia y Tecnología, Investigadora Principal del CONICET, Buenos Aires, Argentina



Introducción

Probablemente la piel, tanto dermis como epidermis, haya sido el primer tejido que se logró producir de forma artificial gracias a los recursos de la Bioingeniería. Un breve recuerdo histórico:

- 1975. Los Drs. Burke y Yahanas en MGH (*Massachusetts General Hospital*) y MIT (*Massachusetts Institute of Technology*), conciben la primera idea y desarrollan un prototipo de dermis artificial (Integra®).
- 1976. El Dr. Howard Green, en el MGH, logra una lámina de queratinocitos *in vitro*.
- 1980. Usos clínicos y mejoras en las técnicas.
- 1992. Sistemas laminares de liberación de células.
- 2000. Desarrollo *in vitro* de dermis y epidermis con células del propio paciente: Dr. Steve Boyce en Cincinnati, EE.UU y Dr. Françoise Auger en Quebec, Canadá.
- 2002. En Italia se desarrolla otra matriz de regeneración dérmica (Hyalomatrix®) hecha de fibras de ácido hialurónico y silastic, imitando la epidermis.
- 2003. Se desarrolló en México un cultivo de queratinocitos alogénicos como sistema de liberación de factores de crecimiento en las lesiones cutáneas.
- En los últimos 10 años aparecen 15 diferentes matrices de regeneración dérmicas
- 2010. Algunos médicos y biólogos comienzan a trabajar en conjunto con bioingenieros en diferentes partes del mundo y surge la idea de imprimir piel con bioimpresoras 3D.
- 2013. Toman impulso los proyectos de impresoras de piel con capacidad de imprimir dermis y epidermis con células del paciente, a medida para cada área, con control de espesor.

En la actualidad, existen 3 métodos para crear impresiones 3D: por Compactación, en las que una masa de polvo se compacta por estratos; por Adición o inyección de polímeros, en las que el propio material se añade por capas; y por Estereolitografía, donde un láser ultravioleta solidifica por estratos una resina líquida.

Un ejemplo de bioimpresora 3D usa tinta biológica que está compuesta por células vivas en suspensión en un líquido y preparado en un cartucho, siendo expulsada mediante un flujo continuo regulable. Esta sustancia contiene diferentes tipos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y de Langerhans, que constituyen la epidermis. Esta bioimpresora funciona con un escáner de láser que analiza el área y la profundidad de una herida, y se transforma la imagen escaneada en digital 3D para calcular la cantidad de capas de células dérmicas que se necesita imprimir para restablecer la condición original del tejido. En EE.UU.

existen ya empresas dedicadas a la Biotecnología que han creado impresoras 3D que utilizan biomateriales y células vivas para crear modelos 3D de tejidos vivos y órganos humanos.⁽¹⁾

Impresión de piel 3D

Funcionamiento. Fabricación

Para controlar la flexibilidad geométrica de los ambientes y las interacciones de célula a célula en 3D, se ha desarrollado una plataforma robótica basada en la tecnología de fabricación de las impresoras 3D. Consta de 8 canales celulares de dispersión controlados de forma independiente, que pueden colocar con precisión las células, la matriz extracelular, los materiales de andamiaje, y los factores de crecimiento en cualquier patrón 3D definido por el usuario.⁽²⁾

Preparación del medio

Se utilizan fibroblastos y queratinocitos para construir el tejido de la piel 3D. Ambas líneas celulares se cultivan a 37 °C en 5% de CO₂ en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle suplementado con suero bovino fetal al 15% y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se pasan rutinariamente en matrices de cultivo de tejido, y se desechan después de 20 pasajes para asegurar la representación de las características clave.

El colágeno precursor de hidrogel (cola de rata, tipo I) se utiliza como material de soporte para la impresión (Fig. 1)

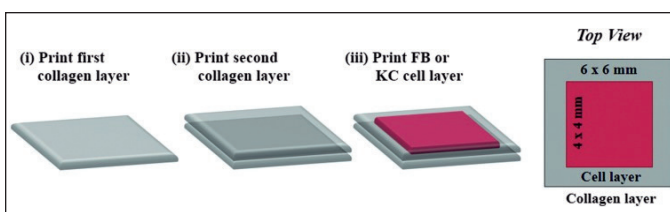


Fig. 1. Esquema del proceso de impresión de colágeno en capas

El material incluye 6 capas de colágeno que alternan con 3 capas de fibroblastos y 2 capas de colágeno que separan las capas apiladas de fibroblastos de los queratinocitos. Se imprimen 2 capas de queratinocitos para conseguir la densidad celular deseada dentro de la epidermis⁽³⁾ (Fig. 2).

Una vez que se establecen los pasos individuales para la impresión de las diversas capas 3D en una placa de Petri, se utiliza un esquema similar para imprimir las estructuras de la piel en un soporte de 12 estructuras de membrana (tamaño de poro: 0.4 micras). Resulta en una condición en la que los queratinocitos se cultivan en el límite de aire-líquido para promover la diferenciación terminal a corneocitos y la progresiva formación de la capa córnea. Este paso es esencial para la formación de un tejido de múltiples capas estratificado, similar a la piel.

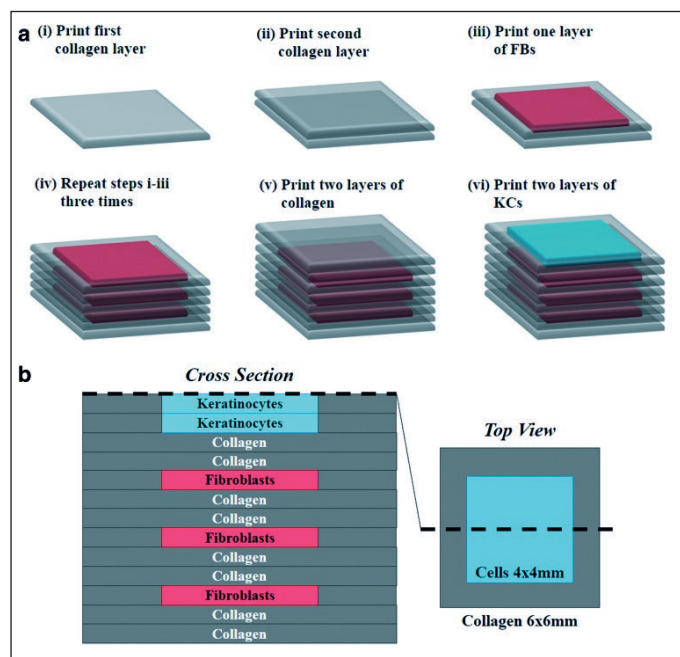


Fig. 2. Esquema que explica la distribución de fibroblastos y queratinocitos entre las capas de colágeno

La estructura dérmica se cultiva hasta que empieza a formar un área cóncava a los 7 días. A continuación, se retira el medio y luego se colocan suavemente en la parte superior de la capa dérmica, durante 3 horas, 500 ml de medio fresco que contiene queratinocitos^(4, 5) (Fig. 3).

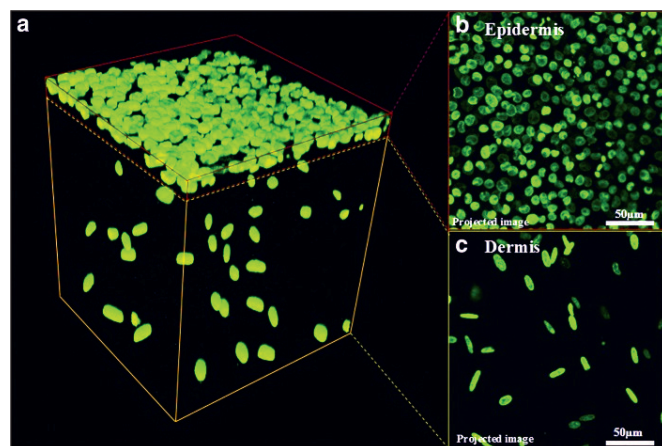


Fig. 3. Imágenes de microscopia confocal.

Después de observar que la viabilidad celular es alta sobre una gama muy amplia de densidades de suspensión celular y el espaciado de las gotas, los 2 parámetros se ajustan para reflejar la densidad de la superficie celular (células/cm²), de los queratinocitos en la epidermis y la densidad volumétrica de células (células/ml) de fibroblastos en la dermis.⁽⁶⁾

La impresión de una sola muestra de tejido de la piel toma aproximadamente 40 minutos. Sin embargo, la impresora es capaz de imprimir 4 muestras simultáneamente, lo que requiere 60 minutos. El modelo de tejido de la piel impresa conserva su forma y dimensiones, sin encogerse, durante todo el período de cultivo.

Se forma un epitelio de múltiples capas que crece en un equivalente dérmico que contiene fibroblastos y matriz de colágeno. La densidad celular de los fibroblastos en la dermis es ligeramente inferior a la de la piel natural; la estratificación y la queratinización, características clave de la epidermis, son incompletas.

Los estudios han demostrado que la unión epitelial-mesenquimal controla la regeneración epidérmica, lo que implica que el estado funcional tanto de los queratinocitos como de los fibroblastos contribuye a la diferenciación epidérmica⁽⁷⁾ (Fig. 4).

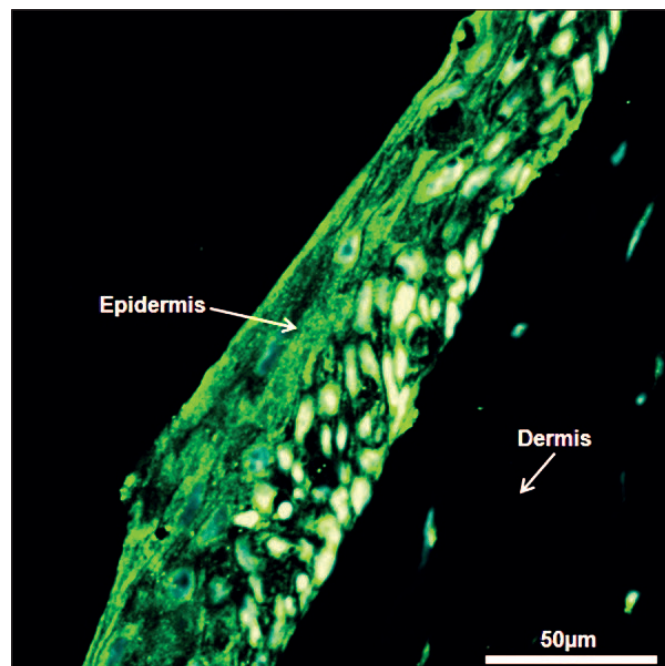


Fig. 4. Inmunofluorescencia del tejido de la piel. Estructuras de la piel impresa: se tiñeron de N-cadherina uniones estrechas a los 14 días. Se observó N-cadherina (verde) bordeando las células epidérmicas adyacentes (núcleos teñidos en azul), pero no se detectó en el compartimento dérmico.

El objetivo de este trabajo es presentar un nuevo enfoque en la bioimpresión de piel en 3D mediante una técnica desarrollada por los autores en el Hospital Alemán de Buenos Aires (Fundación Benaim) y la Universidad de San Martín (UNSAM), también en Buenos Aires (Argentina).

Material y método

El objetivo fue desarrollar una bioimpresora con capacidad de imprimir piel del paciente en quirófano, con las células propias para la capa epidérmica y una matriz extracelular biocompatible y de permanencia programada para la capa dérmica. Comenzamos a trabajar en 2014 y hoy tenemos el modelo terminado y funcionando (Fig. 5).

La bioimpresora tiene un flujo laminar de aire filtrado a 36 °C que, durante el proceso de impresión, pueda minimizar la contaminación y permita el secado de las láminas a temperatura corporal para así mantener la viabilidad celular.



Fig. 5. Tercera generación de bioimpresora para piel desarrollada en Argentina.

Obtenemos una biopsia dermoepidérmica de buena piel con dermatomo de 0.5 mm de espesor. Con un dispositivo electrónico especialmente diseñado (SEPCEL, Separador de Células Epiteliales) (Fig. 6), en 10 minutos se efectúa la separación de las 4 estirpes celulares epidérmicas. Al mismo tiempo extraemos sangre del paciente y en 10 minutos obtenemos por centrifugación el plasma rico en plaquetas (PRP) (Fig. 7).

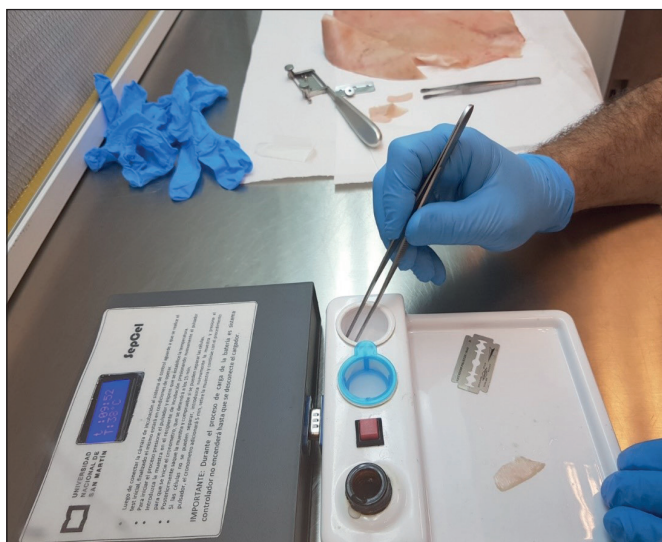


Fig. 6. SEPCEL (Separador Células Epiteliales)

Preparación de la tinta para la dermis

Es una mezcla de colágeno y quitosano en proporciones adecuadas para obtener una porosidad que permita a los fibroblastos y células endoteliales del lecho receptor la invasión y vascularización.

Preparación de la tinta para la epidermis

Se usa la misma mezcla de colágeno y quitosano y se agregan las células epidérmicas y el PRP del paciente, que permite mantener la viabilidad celular durante el tiempo de impresión y la aplicación en el lecho receptor del paciente.

Primero se imprime la dermis y sin solución de continuidad se imprime la epidermis. Para una lámina de 10 x 20 cm, el tiempo aproximado es de 30 minutos.

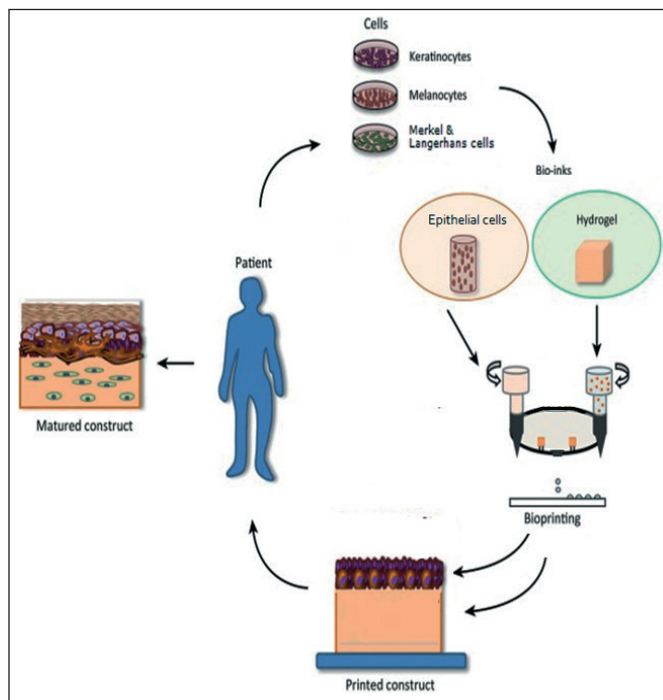


Fig. 7. Esquema de bioimpresión de dermis y epidermis.

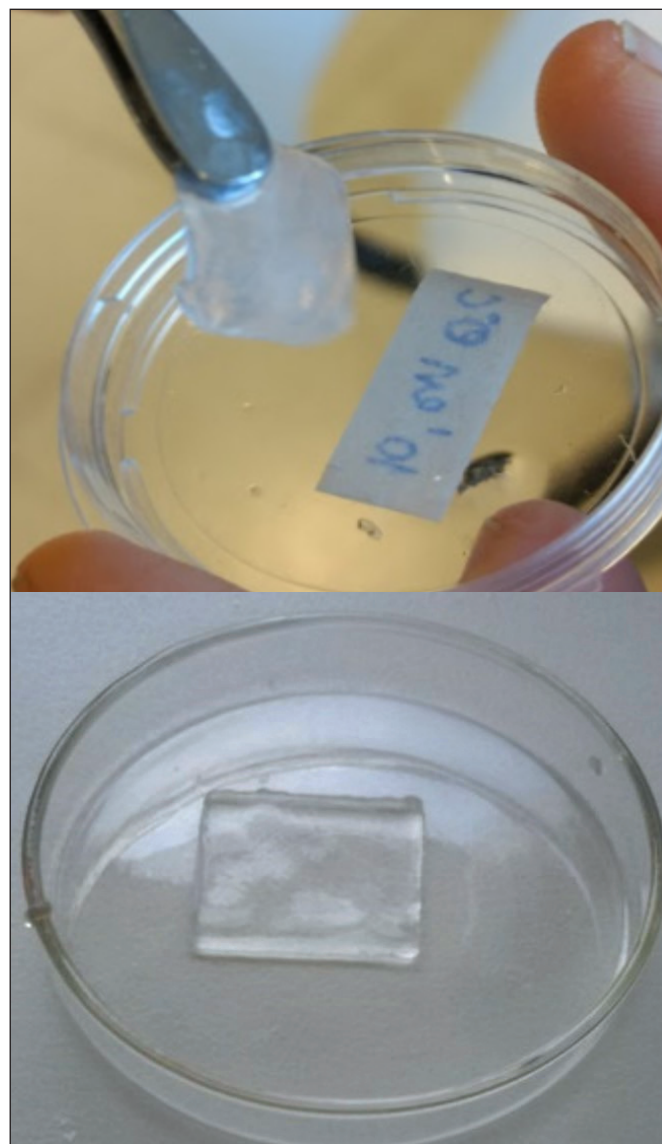


Fig. 8. Membrana transparente dermoepidérmica con células autólogas

Discusión

Con esta técnica podemos minimizar el inóculo celular. Al hacer la siembra dentro de la capa epidérmica, el cultivo se realiza *in vivo*. Al sembrarse las 4 estirpes celulares juntas y recibir los nutrientes del mismo paciente, la expansión celular en una membrana porosa es mucho más rápida (Fig. 8).

Tecnología del poro

Se sabe desde hace 20 años que las células epidérmicas, y algunas dérmicas como las células endoteliales y los fibroblastos, tienden a ser atraídas por diferentes tamaños y formas de poro; es así que se anclan al poro y comienzan a multiplicarse y migrar. Con las impresoras 3D se pueden ubicar poros pequeños o más grandes y al colocar la membrana en el lecho receptor las células pueden ser atraídas al lugar deseado. Por ejemplo, los queratinocitos tienen afinidad por poros de 15 micrones y los fibroblastos por poros de 30 micrones (Fig. 9 y 10).

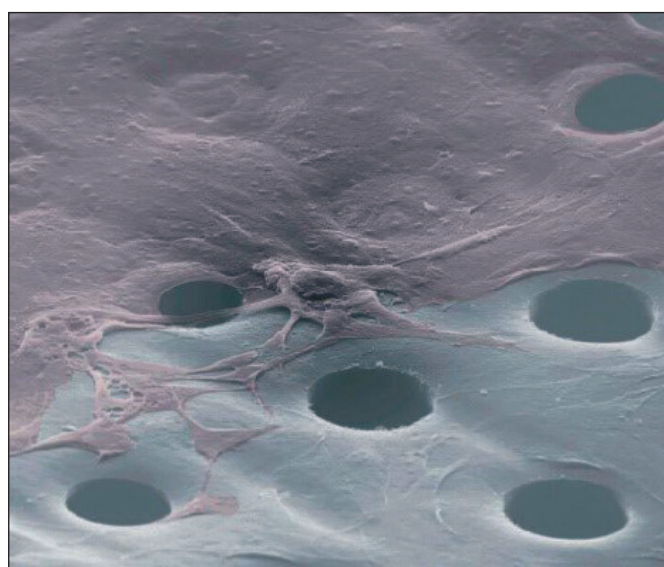


Fig. 9. Fotografía de microscopía electrónica de queratinocito fijándose a membrana porosa (Laserskin)

En el último año, ya han aparecido más de 300 publicaciones sobre bioimpresión 3D de órganos y tejidos. En lo que respecta a la piel, hay 18 grupos de investigadores de distintos países, trabajando con diferentes técnicas en la creación de bioimpresoras multipropósito que permitan imprimir diferentes tejidos; otros investigadores están trabajando en los *softwares* para computarizar estas máquinas y hacerlas más simples y automatizadas. Biólogos y médicos están dedicados al desarrollo de diferentes biotintas, en las que al agregarles las células del propio paciente, células endoteliales, fibroblastos y células madre en el cartucho para dermis y keratinocitos, melanocitos y células de Merkel para el cartucho de epidermis, puedan todas estas células permanecer vivas durante el proceso de impresión. Otros investigadores de Bioingeniería están desarrollando pequeñas bioimpresoras que puedan estar en el quirófano, en la mesa de instrumentación, de manera tal que todas las células puedan obtenerse de una pequeña biopsia y no sea necesario el largo proceso del cultivo celular *in vitro*.

Sin duda, este es un nuevo enfoque para la confección de matrices de regeneración dérmica, en forma rápida, con las células del propio paciente, con un proceso completamente realizado de forma estéril en el quirófano; un gran avance sin duda en todo lo que se refiere al tratamiento del paciente quemado.^(8,9)

Estamos por tanto ante un cambio significativo en la forma de tratar las lesiones cutáneas, agudas y crónicas. La aplicación de impresión 3D más avanzada que se prevé es la bioimpresión de órganos complejos. A medida que la tecnología avanza, se espera que los tejidos heterogéneos complejos, tales como los tejidos del hígado y de los riñones, se puedan fabricar con éxito. Esto abrirá la puerta para hacer implantes vivos viables, así como para el desarrollo de modelos de tejidos y órganos impresos para su uso en el descubrimiento de fármacos.

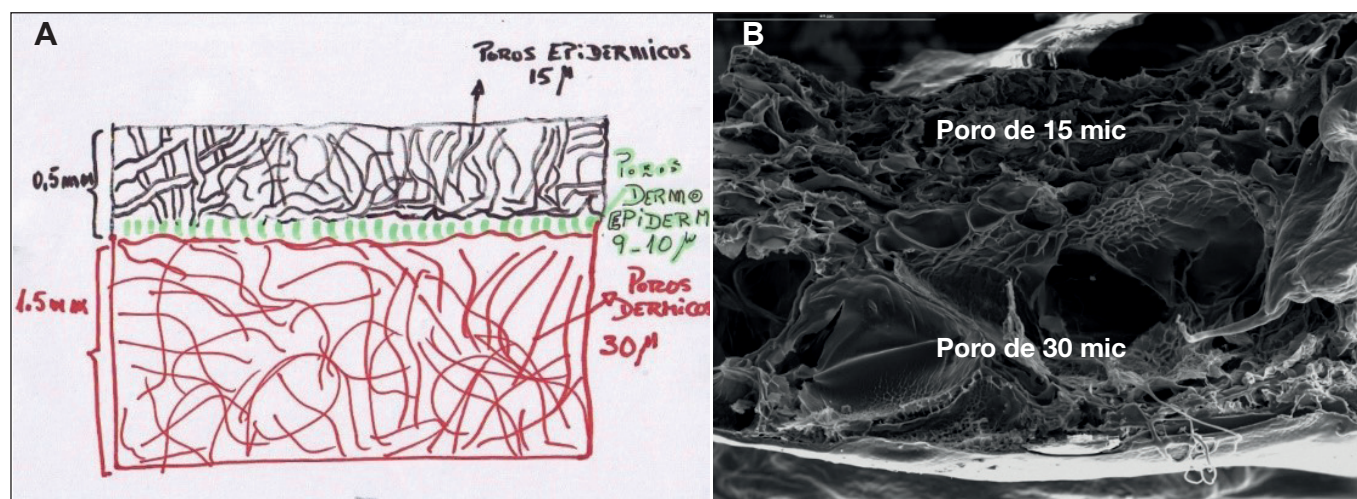


Fig. 10. A. Esquema teórico B. Microscopía electrónica de la membrana obtenida

Conclusiones

La impresión 3D de piel facilita la fabricación de un modelo de piel humana más compleja que incorpora estructuras secundarias y anexiales. Estos modelos pueden llevar a importantes avances en nuestra comprensión de la piel humana como órgano, lo que permite la ingeniería de injertos así como de herramientas de desarrollo de tópicos y formulación transdérmica.

El enfoque descrito aquí puede potencialmente también ser traducido al diseño de modelos de enfermedades autoinmunes de la piel, tales como psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto y vitiligo, así como de modelos de tumores malignos de la piel tales como melanoma, que han conducido al descubrimiento y desarrollo de terapéuticos eficaces contra estas enfermedades así como en el tratamiento de los pacientes quemados.

Dirección del autor

Dr. Alberto Bolgiani
CEPAQ, Hospital Alemán
Av. Pueyrredón 1640
C1118 AAT, CABA, Buenos Aires, Argentina
Correo electrónico: anbolgiani@hospitalaleman.com

Bibliografía

1. **Kamm RD, Bashir R.** Creating living cellular machines. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(2):445-459.
2. **Lee V, Singh G, Trasad JP, et al.** Design and Fabrication of Human Skin by Three Dimension a Bioprinting. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20(6):473-484.
3. **Adams DC, Ramsey ML.** Grafts in dermatologic surgery: review and update on full- and split-thickness skin grafts, free cartilage grafts, and composite grafts. *Dermatol Surg* 2005, 31: 1055-1067.
4. **Lee W, Pinckney J, Lee V.** Three-dimensional bioprinting of rat embryonic neural cells. *Neuroreport* 2009;20:798-803.
5. **Lee W, Debasitis JC, Lee VK. et al.** Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. *Biomaterials* 2009; 30:1587-1595.
6. **Lee W, Lee V, Polio S, Keegan P. et al.** On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels. *Biotechnol Bioeng* 2010; 105:1178-1186.
7. **Schubert C, Van Langeveld MC, Donoso LA.** Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br J Ophthalmol.* 2014;98(2):159-161.
8. **Plastics Today.** FDA tackles opportunities, challenges, of 3D printed medical devices. Jun 2, 2014.
9. **Zhang X, Zhang Y.** Tissue Engineering Applications of Three Dimensional Bioprinting. *Cell Biochem Biophys.* 2015; 72(3):777-782.